

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平8-509366

(43) 公表日 平成8年(1996)10月8日

(51) Int.Cl. ⁸	識別記号	庁内整理番号	F I
A 2 3 J 3/34		9281-4B	A 2 3 J 3/34
A 2 3 L 1/305		9359-4B	A 2 3 L 1/305
C 1 2 N 9/20		8827-4B	C 1 2 N 9/20
	9/54	9152-4B	9/54
	9/62	9152-4B	9/62
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 24 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号	特願平6-523763	(71) 出願人	ノボ ノルディスク アクティーゼルスカ ブ
(86) (22) 出願日	平成6年(1994)4月25日		デンマーク国, デーヨー—2880 バグスバ エルト, ノボ アレ (番地なし)
(85) 翻訳文提出日	平成7年(1995)10月23日	(72) 発明者	ニールセン, ペル ムンク
(86) 国際出願番号	P C T / D K 9 4 / 0 0 1 6 5		デンマーク国, デーヨー—3400 ヒレレ ズ, リテルスティエン 29アー
(87) 国際公開番号	W O 9 4 / 2 5 5 8 0	(72) 発明者	ハバス, ベーター
(87) 国際公開日	平成6年(1994)11月10日		デンマーク国, デーヨー—2880 リングビ ー, トフテベクスバイ 54 エステー, テ ーベ。
(31) 優先権主張番号	0 4 6 7 / 9 3	(74) 代理人	弁理士 石田 敬 (外3名)
(32) 優先日	1993年4月26日		
(33) 優先権主張国	デンマーク (D K)		最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 タンパク質の加水分解方法

(57) 【要約】

アスペルギルス オリゼから由来されそして各々がそれぞれ23kD, 27kD, 31kD, 32kD, 35kD, 38kD, 42kD, 47kD, 53kDおよび100kDから選ばれるおよそその分子量を有する少なくとも5個のタンパク質分解成分を含んでなるタンパク質分解酵素調製品、例えばフレーバーザイム (商標) と共にインキュベートすることによる植物性又は動物性タンパク質の加水分解は食品製品例えば母乳代替物、チーズ、HVP、肉エキス、矯味剤および食品製品の発酵用のプロセス助剤又は非食品製品例えばペットフード、化粧中において又はそれらとして有用なタンパク質加水分解物を提供する。この方法により高度の加水分解 (DE)、風味発生および高タンパク質溶解度を得る。

【特許請求の範囲】

1. タンパク質分解酵素調製品と共にインキュベートすることによるタンパク質の加水分解方法であって、タンパク質分解調製品がアスペルギルス オリゼ (*Aspergillus oryzae*) から由来しそして各々がそれぞれ23kD, 27kD, 31kD, 32kD, 35kD, 38kD, 42kD, 47kD, 53kD, および100kDから選ばれる、おおよその分子量を有する少なくとも5個のタンパク質分解成分を含んでなる、前記方法。
2. タンパク質調製品が、それぞれおおよその分子量23kD, 31kD, 35kD, 38kD および53kDを有する少なくとも5個のタンパク質分解成分を含んでなる、請求の範囲第1項記載の方法。
3. 35%超、好ましくは60%超、より好ましくは70%超、特に80%超のタンパク加水分解の程度 (DH) が得られる、請求の範囲第1又は2項記載の方法。
4. 50%超のPSI、好ましくは70%超のPSI、より好ましくは90%超のPSI (タンパク質溶解度指標 (PSI)) が得られる、請求の範囲第1項記載の方法。
5. タンパク質が植物性タンパク質、好ましくは大豆タンパク質；穀粒タンパク質、例えば小麦グルテン又はゼイン；なたねタンパク質；アルファータンパク質；エンドウ豆タンパク質；マメ科そら豆タンパク質；綿実タンパク質；又はごまの実タンパク質である請求の範囲第1～4項のいずれか1項に記載の方法。
6. タンパク質が動物性タンパク質、好ましくはミルクタンパク質、乳漿タンパク質、カゼイン、肉タンパク質、魚タンパク質、血液タンパク質、卵白又はゼラチンである、請求の範囲第1～4項のいずれか1項に記載の方法。
7. インキュベーションを約4～約10のpHで、好ましくは約5～

約9のpHで行う、請求の範囲第1～6項のいずれか1項に記載の方法。

8. タンパク質を、1種又はそれ以上のプロテアーゼ調製品と組合せたタンパク質分解調製品と共にインキュベートする、請求の範囲第1～7項のいずれか1項に記載の方法。

9. プロテアーゼ調製品が、バシラス (*Bacillus*)、好ましくはバシラス ズブチリス (*Bacillus subtilis*) 由来の中性プロテアーゼである、請求の範囲第8項記載の方法。

10. プロテアーゼ調製品が、バシラス (Bacillus)、好ましくはバシラス リケニホルミス (Bacillus licheniformis) 由来のアルカリプロテアーゼである、請求の範囲第8項記載の方法。

11. タンパク質を、1種又はそれ以上のリパーゼ調製品と組合わせたタンパク質分解調製品と共にインキュベートする、請求の範囲第1～10項のいずれか1項に記載の方法。

12. リパーゼ調製品が、ムコール (Mucor)、好ましくはリゾムコール マイヘイ (Rhizomucor miehei) に由来する真菌リパーゼを含んでなる、請求の範囲第11項記載の方法。

13. リパーゼ調製品が、アスペルギルス (Aspergillus)、好ましくはアスペルギルス ニガー (Aspergillus niger) 由来の真菌リパーゼを含んでなる、請求の範囲第11項記載の方法。

14. タンパク質が加水分解されそして同時に食品製品に発酵される、請求の範囲第1～13項のいずれか1項に記載の方法。

15. 請求の範囲第1～13項のいずれか1項に記載の方法によって得られるタンパク質加水分解物。

16. 加水分解タンパク質が、ミルクタンパク質、乳漿タンパク質、カゼイン、肉タンパク質、魚タンパク質、血液タンパク質、卵白又はゼラチンから成る群から選ばれる動物性タンパク質である、請

求の範囲第15項記載のタンパク質加水分解物。

17. 加水分解タンパク質が、大豆タンパク質；穀粒タンパク質、例えば小麦グルテン又はゼイン；なたねタンパク質；アルファータンパク質；エンドウ豆タンパク質；マメ科そら豆タンパク質；綿実タンパク質；およびごまの実タンパク質から成る群から選ばれる植物性タンパク質である、請求の範囲第15項記載のタンパク質加水分解物。

18. 請求の範囲第15～17項のいずれか1項に記載のタンパク質加水分解物を含んでなる食品製品。

19. 母乳代替品成分；チーズ風味製品；酵素的に生産されたHVP；タンパク質

富化ダイエット製品；スープ、ブイヨン又は肉－風味製品；肉エキス製品；又はスターター培養の生産を改善するための加水分解物である、請求の範囲第18項記載の食品製品。

20. 請求の範囲第15～17項のいずれか1項に記載のタンパク質加水分解物を含んでなる、非食品製品。

21. ペットフード、化粧品又は発酵プロセスである、請求の範囲第20項記載の非食品製品。

【発明の詳細な説明】

タンパク質の加水分解方法

技術分野

本発明は、タンパク質の加水分解方法、該方法によって得られるタンパク質加水分解物および該タンパク質加水分解物を含有する食品以外の生産物に関する。

背景技術

タンパク質の加水分解方法は、例えば英国特許1,507,380、米国特許3,723,250および国際公開WO 89/00272、WO 92/13964およびWO 90/05462に記載されてきた。

高度のタンパク質加水分解および秀れた感覚刺激性を有する加水分解物をもたらすタンパク質の加水分解方法に対する必要性が存在する。

発明の要約

今や以下の内容が見出された；すなわちアスペルギルス オリゼ (*Aspergillus oryzae*) から由来しそして商標「フレーバーザイム」(Flavourzyme) 名でノボ ノルディスク A/Sから市販されているタンパク質分解酵素調製品が秀れたタンパク質加水分解特性を有し、例えば高度の加水分解と苦みのない加水分解物を得ることが可能である。

従って、本発明はアスペルギルス オリゼから由来しそして商標「フレーバーザイム」名でノボ ノルディスク A/Sより市販されているタンパク質分解調製品を用いてインキュベーションするこ

とによるタンパク質の加水分解方法に関する。

その第二の面において、本発明は本発明方法によって得られるタンパク質加水分解物を提供する。

別の面において、本発明のタンパク質加水分解物を含んでなる食品および食品以外の生産物に関する。

図面の簡単な説明

本発明を添付の図面を参照して更に説明する。

図1はpH5～9 (■: pH5、▲pH6、○pH7、□pH8、●pH9) のpH範囲内に

においてナトリウムカゼインに適用された本発明方法によって達成される加水分解の時間（時）対加水分解の程度（%DH）を示す；

図2は本発明方法に従い22時間の加水分解後の大豆タンパク質分離物の加水分解の程度（%DH）を示し（■：フレーバーザイム、▲：コロラーゼ（Corolase）（商標）7092、◇：コロラーゼ（Corolase）（商標）7093、◆：アルカラーゼ（Alcalase）（商標）、□：ニュートラーゼ（Neutrase）（商標）；そして

図3は本発明方法に従い22時間の加水分解後、Na-カゼイネートの加水分解の程度（%DH）を示す（■：フレーバーザイム（商標）、▲：コロラーゼ（商標）7092、◇：コロラーゼ（商標）7093、◆：アルカラーゼ（商標）、□：ニュートラーゼ（商標））。

発明の詳細な開示

フレーバーザイム（商標）について特性記述により以下の内容が示された；すなわちタンパク質分解アスペルギルス オリゼ調製品は幾つかのタンパク質分解成分を含んでなる。該調製品は5個又はそれ以上のタンパク質分解酵素成分を含んでなると思われ、その各

々は次のおおよその分子量：23kD、27kD、31kD、32kD、35kD、38kD、42kD、47kD、53kDおよび100kDのいずれかを有することができる。

従って、本発明はアスペルギルス オリゼから由来しそしてそれぞれ23kD、27kD、31kD、32kD、35kD、38kD、42kD、47kD、53kDおよび100kDから選ばれる、おおよその分子量を有する少なくとも5個のタンパク質分解成分を含んでなるタンパク質分解酵素調製品と共にインキュベートすることによるタンパク質の加水分解方法を提供する。

好ましい態様において、タンパク質はアスペルギルス オリゼから由来されそしてそれぞれおおよその分子量23kD、31kD、35kD、38kDおよび53kDを有する少なくとも5個のタンパク質分解成分を含んでなるタンパク質分解調製品と共にインキュベートされる。

タンパク質分解調製品中のプロテアーゼ成分の分子量を、当業者に公知の方法によりSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）を用いて測定した。こ

の方法により、各プロテアーゼ成分の分子量を測定した。

本発明方法はタンパク質の広範囲のタンパク質加水分解を行うことが可能であり、そしてこの方法は苦みのない加水分解物並びにきわだったスープ味／肉味を有する加水分解物をもたらす。

タンパク質の加水分解の程度は、達成される加水分解の程度により決定され得る。本発明に関連して、加水分解の程度 (DH) は次式により定義される：

$$DH = \frac{\text{分解したペプチド結合の数}}{\text{ペプチド結合の総数}} \times 100\%$$

DHは、アドラーニッセン；Enzymic Hydrolysis of Food Proteins；エルスビール アプライド サイエンス出版社（1986）、122

頁に従って計算できる。

本発明方法を用いることにより、35%以上、好ましくは60%以上、より好ましくは70%以上、最も好ましくは80%以上のDHを得ることが可能である。

本発明方法により、高程度のタンパク質溶解度を得ることも可能である。タンパク質の溶解度の程度は、アドラーニッセン（前掲）により記載される如くタンパク質溶解度指数 (PSI) により記載することができる。

好ましい態様において、50%PSI以上、好ましくは70%PSI以上、より好ましくは90%以上のタンパク質溶解度が得られる。

本発明方法により有利に加水分解され得るタンパク質又はタンパク質様物質は、どんな植物性タンパク質であってもよく、例えば大豆タンパク質、穀粒タンパク質、例えば小麦グルテン又はゼイン、なたねタンパク質、むらさきうまごやしタンパク質、えんどうタンパク質、マメ科そら豆タンパク質、綿実タンパク質又はごまの実タンパク質であり、又はどんな動物性タンパク質又はタンパク質様物質であってよく、例えば乳タンパク質、乳漿タンパク質、カゼイン、肉タンパク質、魚タンパク質、血液タンパク質、卵白又はゼラチンであってよい。

満足できる程度の加水分解を得るため、タンパク質分解酵素は100 gのタンパク質当たり0.05-15AU、特に100 gのタンパク質当たり0.1-8 AUの量でタンパク質又はタンパク質様物質に好ましく添加される。

インキュベーションは、約4～約10のpH、好ましくは約5～約9のpHで行うことができる。例2で示すように、本発明は極端なpH条件でさえ、すなわち5～9の範囲内の全てにおけるpH値で秀れて行うことができる。

インキュベーションは、酵素調製品が失活しない、すなわち約20℃～約70℃の範囲内におけるいずれの好都合の温度で行うことができる。

確立された慣習に従い、タンパク質分解酵素調製品は、インキュベーション混合物の温度を約70℃超に増加することにより、又はインキュベーション混合物のpHを約4.0未満に減少させることにより適切に失活され得る。

別の好ましい態様において、タンパク質又はタンパク質様基質のインキュベーションは、フレーバーザイム（商標）および1種又はそれ以上の他のプロテアーゼ調製品の組合わせを用いて行うことができる。

好ましいプロテアーゼ調製品は、中性又はアルカリ性プロテアーゼを含んでなる。適当な中性プロテアーゼの例は、バシラス由来の中性プロテアーゼ、好ましくはバシラス ズブチリス由来の中性プロテアーゼ、例えば商標ニュートラーゼ（Neutrase）名で、ノボノルディスク（デンマーク）より市販されている酵素調製品である。適当なアルカリプロテアーゼの例は、バシラス由来のアルカリプロテアーゼ、好ましくはバシラス リケニホルミス（*Bacillus licheniformis*）由来のアルカリプロテアーゼ、例えば商標アルカラーゼ（Alcalase）名で、ノボノルディスク（デンマーク）より市販されそして活性成分としてズブチリシンA（ズブチリシン カルスベルク（*Subtilisin carlsberg*））を含有する酵素調製品である。

本発明方法で行なわれるインキュベーションは、またフレーバーザイム（Flavourzyme）（商標）および1種又はそれ以上の他のリパーゼ調製品の組合わせを用いて行うこともできる。

好ましいリパーゼ調製品は、菌類リパーゼを含んでなる。適当な菌類リパーゼの例は、ムコール（*Mucor*）由来のリパーゼ、好ましくは

はリゾムコール マイヘイ（*Rhizomucor miehei*）由来のリパーゼ、例えば商標

パラターゼ (Palatase) 名で、ノボ ノルディスク (デンマーク) より市販されている酵素調製品；およびアスペルギルス (Aspergillus) 由来のリパーゼ、好ましくはアスペルギルス ニガー (Aspergillus niger) 由来のリパーゼ、例えば商標パラターゼ (Palatase) A名でノボ ノルディスク (デンマーク) より市販されている酵素調製品を含んでなる。

別の態様において、本発明は本発明方法によって得られるタンパク質加水分解物を提供する。

AUの測定

タンパク質分解活性は、基質としてヘモグロビンを用いて測定できる。

タンパク質分解活性の測定に対するアンソン-ヘモグロビン法において、変性ヘモグロビンが消化され、そして未消化ヘモグロビンは三塩化酢酸 (TCA) により沈殿される。TCA可溶性生成物の量は、フェノール試薬を用いて測定され、そのフェノール試薬はチロシンおよびトリプトファンに関して青色を与える。

1 アンソン単位 (AU) は、標準条件下 (すなわち、25℃、pH 7.5および10分の反応時間)、初期速度で、1分当たり1ミリ当量のチロシンと同じ色をフェノール試薬で与えるTCA可溶性生成物の量を遊離するような酵素の量として定義される。

より詳細な分析方法を記載する折りたたんだ印刷物AF 4/5は、請求によりノボ ノルディスク A/S, DK-2880, バグスバエルト, デンマークから入手可能であり、この印刷物をその番号を引用して本明細書に含まれる。

LUの測定

リパーゼ活性の分析：

リパーゼに対する基質を、乳化剤としてアラビアゴムを用いグリセリン-トリブチレート (MERCK) を乳化することにより調製した。

リパーゼ活性をpHスタット法を用いpH 7で分析した。1単位のリパーゼ活性 (LU/mg) は、1分当たり1マイクロモルの脂肪酸を遊離するために必要とされる量として定義される。

工程1：発酵上澄みを遠心分離し、沈殿物をすてる。上澄みのpHを7に調節し

次いで同容量の冷96%エタノールを徐々に加える。混合物を30分間氷浴中に放置する。遠心分離し次いで沈殿物をすてる。

工程2：イオン交換クロマトグラフィー。上澄みを濾過し次いで50mMのトリスーアセテート緩衝液（pH7）で平衡にしたDEAE-高速流（ファルマシアTM）カラムに適用する。280nmでの吸収が0.050D未満になるまで、同緩衝液を用いてカラムを洗浄する。5倍カラム容量を用い、同緩衝液の線状塩勾配（0から0.5M NaCl）で結合酵素活性を溶出する。

工程3：疎水性クロマトグラフィー。固体酢酸アンモニウムを加えることにより、酵素活性を含有するプールのモル濃度を0.8Mに調節する。0.8Mの酢酸アンモニウムで予じめ平衡化したTSKゲルブチレートヨパール650Cカラム（東ソー（株）、日本から入手可能）に酵素を適用する。未結合物質を0.8M酢酸アンモニウムで洗い次いで結合物質を蒸留水で溶出する。

工程4：リパーゼ活性含有プールを水で希釈しコンダクタンスを2mSおよびpHを7に調節する。50mMのトリスーアセテート緩衝液（pH7）で予じめ平衡化した高速Qセファロース（ファルマシア）カラムにプールを適用する。結合酵素を線状塩勾配で溶出する。

食品生産物

別の面において、本発明は本発明のタンパク質加水分解物を含ん

でなる食品生産物に関する。

食品生産物に配合されるタンパク質加水分解物の量は、典型的には1-30重量%の範囲にあるであろう。

本発明の重要な食品生産物は、例えば母乳代替物の成分である。本発明方法によって得られる高程度の加水分解のため、本発明のタンパク質加水分解物は好都合に母乳代替物中に配合でき、この加水分解物は未加水分解乳タンパク質よりも著しくより低いアレルギー性を有する。乳代替物は、このタイプの生産物に対する従来文献（例えば、ヨーロッパ特許出願322,589）に示された方法と実質的に同じ方法で製剤化できるが、但し、公知生産物に含まれるタンパク質加水分解物は本発明のタンパク質加水分解物により代替される。

本発明の食品生産物は又、タンパク質補促物として又は食品生産物の他の性質を提供するため本発明のタンパク質加水分解物を含有できる。従って、食品生産物中に配合されるタンパク質加水分解物は、砕いた骨を本発明方法に委ねることにより骨から引き裂かれた肉又は切れはしの肉（例えばいわゆる機械的に回収される肉、すなわち通常の肉片が屠殺場内の動物死体から刻まれた後に骨上に残っている肉）に例えば基づくことができる。一般的手順のより詳しい記載に対しては、出願人の同時係属国際特許出願WO 90/05462を参照のこと。肉産業からの他のタンパク質副生産物もまた使用できる。

次いで得られたタンパク質加水分解物は乳化肉製品、例えばソーセージ又はパテス (pates) に適当に添加できあるいは又スープもしくは他の食品製品中調味料成分として添加できる。

本発明方法によりウシのミルクから得られる食品製品は、チーズ風味製品である。ミルクタンパク質の広範囲な加水分解は、非常に明確なチーズ風味を有する風味化合物をもたらす。本発明のそのよ

うなチーズ風味製品は、スナック製品、模擬チーズ製品において、又は一般にチーズ風味の増強剤として好ましく適用を見出す。チーズ風味は十分確立された慣習に従いリパーゼの使用によって調節され得る。

調味料製品として使用するための加水分解された植物性タンパク質 (HVP) を製造するための伝統的方法は、高温でかつ長期間塩酸中で煮沸することを基礎にする。これは塩素含有化合物の未所望の形成を引き起こすことが知られている。本発明方法により、酵素的に生産されたHVP製品（これはより健康的製品であると考えられる）を得ることが今や可能である。本発明方法により得ることのできる高DHは、望ましい風味特性および風味増強特性をもたらす。

本発明方法はまた、本発明方法によって得られる苦みのない風味のためタンパク質に富んだ規定食製品に対しても使用できる。本発明方法に関連した非常に幅広いpH域における極めて高いタンパク質の可溶性もまた有利である。

驚くべきことに次の内容が見出された；すなわち秀れた発酵培地がミルクを本発明方法に委ねることにより製造できる。そのようなミルク加水分解物は、比較

的少量で添加することによりヨーグルト製造における発酵の加促のためまたは乳酸スターター細菌培養物の製造において使用できる。プロセス時間を短縮すると、生産能力が増加しそして感染、例えばバクテリオファージ感染の危険性が減少する。

従って、本発明方法は発酵プロセス、好ましくは食品製品の製造に対する発酵プロセスと組合わせて用いることができる。従って、本発明方法で用いられるタンパク質分解調製品、例えばフレーバーザイム (Flavourzyme) (商標) 又は本発明のタンパク質加水分解物又は双方は、発酵プロセス、好ましくは食品発酵プロセスにおいて発

酵プロセスの生産性を高めるために加えることができる。そのような発酵プロセスの例は、魚 (魚ソース)、ココア豆又は大豆 (例えば大豆ソース、テンペ (tempeh)、ミソ (miso)) を含むか又は発酵プロセスである。タンパク質分解酵素の添加又はタンパク質加水分解物の添加は、総プロセス時間の減少、すなわち発酵速度の増加に対して有用である。

非食品製品

本発明方法はその適用を非食品分野にも見出し得る。本発明によって得られる風味特性は、ペットフードの生産に対して好都合に用いられる。

ゼラチンからの極めて高いDH-加水分解物の生産は、化粧品例えばクリームおよびシャンプーに配合すべきゼラチン製品を改良する。

前述の発酵媒質としての特別の効果は、本発明の加水分解物をして同様に他の発酵に対して有用なさしめることが期待される。次の実施例により更に本発明を説明するがそれらはいかなる場合も権利要求される本発明の範囲を制限するものではない。

例 1

牛肉加水分解

この例において、次の酵素調製品 (タンパク質含量基準で%w/wで示される) を用いて行った:

調製品A) 2%フレーバーザイム (Flavourzyme) (商標) (2.30AU/g)、

調製品B) 1%フレーバーザイム (Flavourzyme) (商標)、2%ニュートラーゼ (Neutrase) (商標) 0.5L、および0.15%アルカラーゼ (Alcalase) (商標) 2.4L。

全ての酵素は、ノボ ノルディスク A/S, デンマークから入手可能である。フレーバーザイム (Flavourzyme) (商標) は、アルベ

ルギルス オリゼ (*Aspergillus oryzae*) から由来するタンパク質分解調製品であり、ニュートラーゼ (Neutrase) (商標) 0.5Lはバシラス ズブチリス (*Bacillus subtilis*) 由来のタンパク質分解調製品でありそしてアルカラーゼ (Alcalase) 2.4Lは、バシラス リケニホルミス (*Bacillus licheniformis*) 由来のタンパク質分解調製品である。

408gの牛肉を2回細かく切り刻み次いで392gの水と混合し10%w/wのタンパク質含量とした。混合物を30秒間混合し次いで55℃に加熱した。初期浸透圧重量モル濃度 (mOsm) および可溶性乾燥物質 (° Brix) を測定し、次いで引き続き加水分解をこれらの値により監視した。

4時間のインキュベーション後、酵素を90℃で30分間加熱することにより失活させた。加水分解物を3000×Gで15分間遠心分離に委ねそして積量した。遠心分離物を翌日まで冷蔵庫内で保存し、脂質相が分離しそして積量した。遠心分離物のpHは5.85であった。

結果を下記の表1および表2に示す。

表 1

初期浸透圧重量モル濃度 (mOsm) および可溶性乾燥物質 (° Brix)

時間 分	調 製 品 A			調 製 品 B		
	mOsm/kg	ΔmOsm/kg	° Brix	mOsm/kg	ΔmOsm/kg	° Brix
0	203	0	3.9	202	0	4.5
15				360	158	9.9
45	490	287	11.1	484	282	11.1
60	534	331	11.6			
90	576	373	12.3	534	332	12.3
120	623	420	12.7	579	377	12.8
180	685	482	13.5	624	422	13.3
240	726	523	13.8	663	461	13.7

表 2

調製品 A

混合物	重量 g	タンパク質 %	タンパク質 g	タンパク質 の収率 %	DS*
肉/水	800	10	80		15
脱脂 遠心分離物	689	9.46	65.2	81.5	10.6

* 乾燥物質

表から計算される如く、これらの実験において用いられたフレーバーザイム (Flavourzyme) (商標) の用量は収率を通常45%から81.5%に増加させ、そして溶解度は通常57%から89.9%PSIに増加する。加水分解の程度70.2%DHが達成された。

加水分解物を試験パネル前に4%溶液中に保存した。肉風味は、調製品Aを用いて得られた加水分解物において最も明確であった。

例 2

種々のpHでの加水分解

この実験において、本発明方法を基質としてナトリウムカゼイネートを用い5～9の範囲内のpH値で行った。

ナトリウムカゼイネート（ミプロダン（Miprodan）（商標）30、MDフードAmba（デンマーク）から得られる）の8%（w/w）溶液を、80℃に加熱することにより製造した。800gのこの溶液に、1gのメチルー4-ヒドロキシベンゾエートおよび0.15gのプロピルー4-ヒドロキシベンゾエートを添加し、次いで溶液の温度を50℃に下げた。4NのNaOH又は4NのHClを用いてpHを所望値に調節した。

タンパク質含量基準で1%w/wのフレーバーザイム（Flavourzyme）（商標）（2.30AU/g、ノボ ノルディスク A/S、デンマーク）を溶液に加え、次いでインキュベーションを行い最大の加水分解まで進行せしめた（約22時間）。

pH9.00、8.00、および7.00で、加水分解をpHスタット中に行い、次いでインキュベーションをNaOHの消費により監視した。pH6.00および5.00（初期pH）で、減少したpHおよび増加した浸透圧重量モル濃度により加水分解を監視した。

0.25、1、2、4.5および22時間のインキュベーション後サンプルを得た。85℃で3時間加熱し、次いで氷-水中で冷却することにより酵素を失活させた。結果を図1に示す。この図から明らかなように本発明方法はpH5～pH9のpH域で加水分解を与えることが可能である。

例 3

比較例

この例において、本発明方法（フレーバーザイム（Flavourzyme）（

商標）を用いたインキュベーション）によって得られる加水分解の程度（DH）を、他の公知のタンパク質分解調製品を用いてインキュベーションすることによって得られたDHと比較した。

4N NaOHで調節されたpH7.00で開始し、実験を非pHスタット加水分解として（加水分解中pHの調節なし）50℃で行なった。同じ酵素用量を確保するため、AU/gで現わされた（注：AUの定義については前記参照）同じタンパク質加水分解活性を用い各加水分解を行った。

2種のタンパク質原料を試験した：

- 1) Na-カゼイネート (MDフードAmba (デンマーク) より市販)
- 2) 大豆タンパク質単離物 (タンパク質テクノロジーインタナショナル (米国) より市販)。

タンパク質原料の8% (タンパク質含量基準w/w) 溶液2500gを調製した。
タンパク質溶液を85℃で3分間熱処理し次いで加水分解温度50℃に冷却した。

400gのサンプルを加水分解に対して調整した。以下の酵素および酵素用量を用いた：

酵 素	活性、 AU/g	400g 当 たりの用量
フレーバーザイム (Flavourzyme) 、 ノボ ノルディスク A/S	3.36	0.321 g
ニュートラーゼ (Neutrase) 0.5L、 ノボ ノルディスク A/S	0.484	2.231 g
アルカラーゼ (Alcalase) 2.4L、 ノボ ノルディスク A/S	2.58	0.419 g
コロラーゼ (Corolase)7093、ローム会社	0.094	11.489 g
コロラーゼ (Corolase)7092、ローム会社	1.54	1.426 g

加水分解を22時間続けて行った。

加水分解の程度を、加水分解の5時間および22時間後それぞれ測定した。結果を図2 (大豆タンパク質単離物) および図3 (Na-カゼイネート) に示す。結果から、フレーバーザイム (Flavourzyme) を用いた加水分解は最高度の加水分解を生じさせることが明らかである。

例 4

チーズ風味生産

全乳を100℃で2分間加熱処理し次いで引き続き50℃に冷却した。各々200mlの4個の部分を調製した (タンパク質含量を基準に%w/wで示す)

- 1) 1%のフレーバーザイム (Flavourzyme) (商標) (2.30AU/g)
- 2) 1%のフレーバーザイム (Flavourzyme) (商標) (2.30AU/g) +0.15%

パラターゼ (Palatase) (商標) M 200 L (ノボ ノルディスク A/S, デンマークから市販200LU/g)

3) 0.15%のパラターゼ (Palatase) (商標) M 200 L (ノボ ノルディスク A/S, デンマークより市販200LU/g)

4) 対照

加水分解を50℃で20時間行った。強いチーズ風味がサンプル1, 2および3において現われたが、一方対照は殆ど中性であった。

風味-サンプル1, 2および3を今やクリームチーズ内に希釈し、そして4番目のサンプルを対照として調製した。

1.1) 0.5 gのサンプルNo. 1 + 20 gのチーズ

2.1) 6.0 gのサンプルNo. 2 + 20 gのチーズ

3.1) 6.0 gのサンプルNo. 3 + 20 gのチーズ

4.1) 6.0 gの新鮮なミルク + 20 gのチーズ。

サンプルNo. 1.1 (フレーバーザイム (商標)) は非常に強くかつ濃い風味および十分熟したチーズの味を有するように思われた。サン

プルNo. 2.1 (フレーバーザイム (商標) + パラターゼ (商標)) は良好に均衡したチーズ風味を有するように思われた。サンプルNo. 1.1およびNo. 2.1に比較すると、サンプルNo. 3.1は最も希薄な味覚印象を与えた。参考サンプルNo. 4.1は、すっぱい/少しすっぱいであると評価した。

結論として、酵素フレーバーザイム (Flavourzyme) (商標) 並びにフレーバーザイム (商標) とパラターゼ (Palatase) (商標) の組合わせをミルクに直接加え秀れたチーズ風味を形成することが可能である。

チーズ風味を生産する伝統的方法は、リパーゼおよびプロテアーゼをチーズに添加することにより行なわれる。すなわち、フレーバーザイム (Flavourzyme) (商標) 並びにパラターゼ (Palatase) (商標) と組合わせたフレーバーザイムは、チーズ風味を生産するために新規かつはるかにより簡単な方法を与える。

例 5

加促されたヨーグルト発酵

全乳を100℃で2分間熱処理し次いで引き続き50℃に冷却した。200mlの2つの部分を調製した（タンパク質含量に基づき% w/wで示す）：

1) 1%フレーバーザイム（商標）（2.30AU/g）

2) 対照

加水分解を50℃で20時間行った。次いで酵素を80℃で5分間熱処理することにより変性した。

スキムミルクを90℃で2分間熱処理し次いでこれらのサンプル200mlを調製した。

1. 1) 200mlのミルク+10mlのサンプルNo. 1

2. 1) 200mlのミルク+10mlのサンプルNo. 1

3. 1) 200mlのミルク

温度を41℃に調節し、次いでChr. ハンセンラボラトリーからのヨーグルト培養菌YC DVSを、g当たり 10^6 個の細菌のレベルで全ての3個のサンプルに加えた。

発酵曲線をpHを測定することにより追跡した、下記表4参照。

表 4

酸性化過程

(pH)	1) フレーバーザイム（商標）	2) ブラインド	3) ブラインド／ブラインド
初期pH値	6.6	6.5	6.5
200分後のpH	5.9	6.4	6.4
360分後のpH	4.4	5.9	6.3

pH測定から以下の内容が明らかである；すなわち、フレーバーザイム（商標）加水分解ミルクの添加は発酵を加促し、このことは発酵された乳製品の生産時間が相当に減少され得ることを意味する。

【図1】

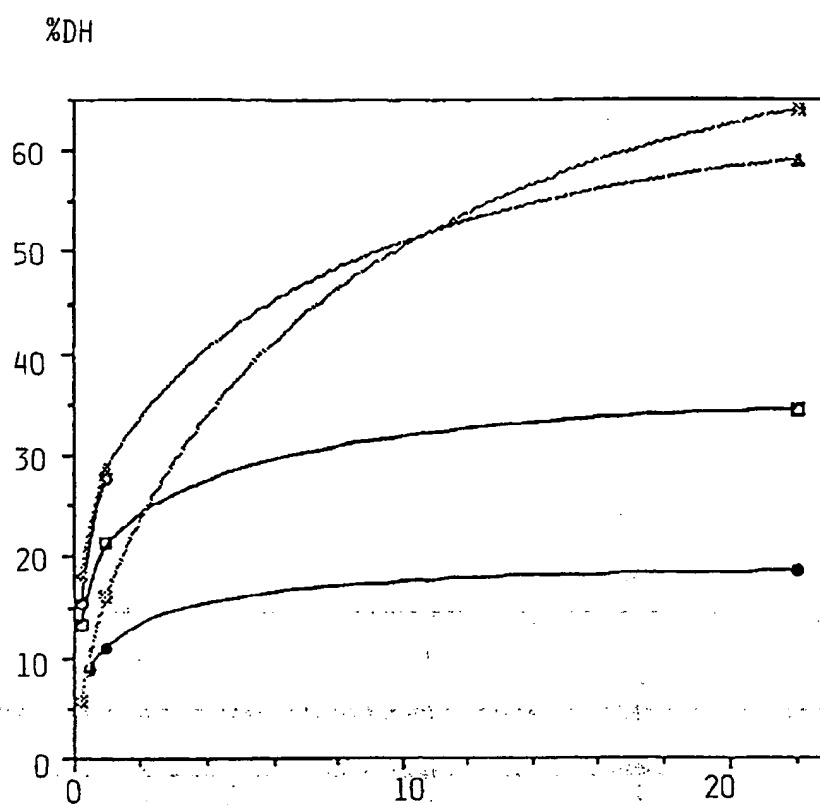


Fig. 1

【図2】

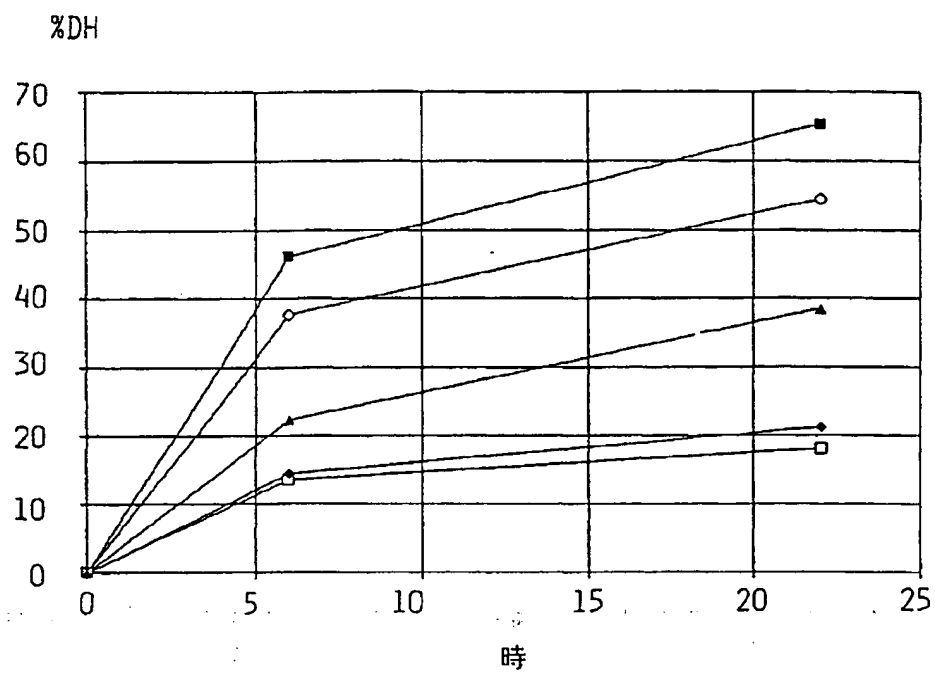


Fig. 2

【図3】

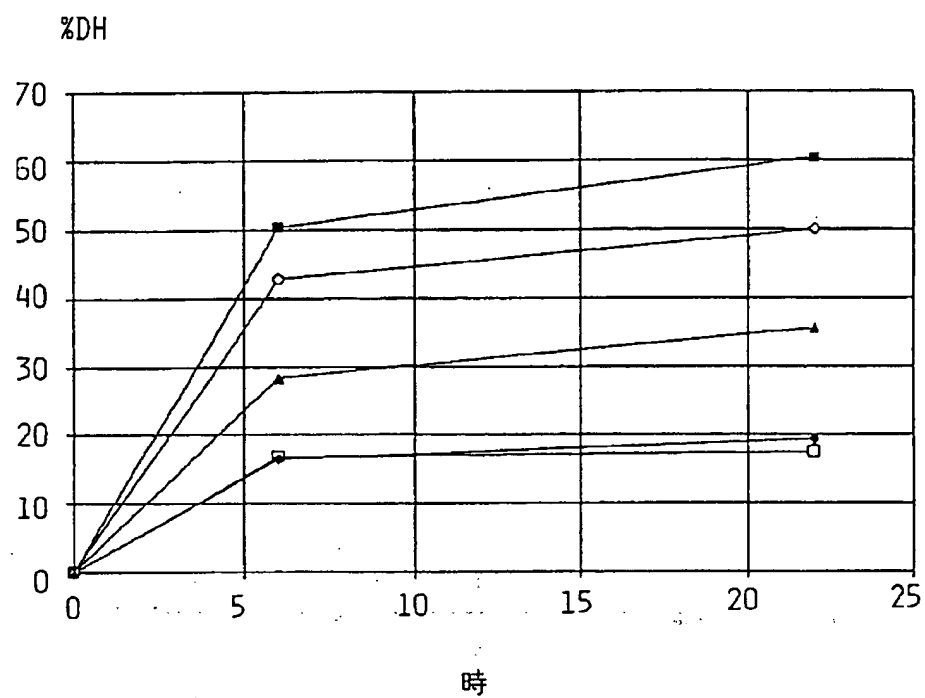


Fig. 3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT.

International application No.

PCT/DK 94/00165

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC : C12N 9/62, A23J 3/34 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
IPC : A23J, A23L, C12N, C12R		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
SE,DK,FI,NO classes as above		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
EPOQUE, MEDLINE, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DE, A1, 3306009 (RÖHM GMBH), 23 August 1984 (23.08.84); whole document	1-21
X	EP, A1, 0429760 (SOCIÉTÉ DES PRODUITS NESTLÉ S.A.), 5 June 1991 (05.06.91), whole document	1-21
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
22 July 1994		29 -07- 1994
Name and mailing address of the ISA/ Swedish Patent Office Box 5055, S-102 42 STOCKHOLM Facsimile No. +46 8 666 02 85		Authorized officer Jack Hedlund Telephone No. +46 8 782 25 00

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

02/07/94

International application No.
PCT/DK 94/00165

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
DE-A1- 3306009	23/08/84	AT-B- 389894 CH-A,B- 662475 FR-A,B- 2541308 NL-A- 8304449	12/02/90 15/10/87 24/08/84 17/09/84
EP-A1- 0429760	05/06/91	SE-T3- 0429760 AU-B- 637814 AU-A- 6106290 CA-A- 2023477 CH-A- 679542 CN-A- 1052246 DE-U- 6900066 JP-A- 3168066 US-A- 5141757	10/06/93 30/05/91 28/05/91 13/03/92 19/06/91 04/02/93 19/07/91 25/08/92

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

フロントページの続き

(51) Int. Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I
/(C 1 2 N 9/20			
C 1 2 R 1:685)			
(C 1 2 N 9/20			
C 1 2 R 1:785)			
(C 1 2 N 9/54			
C 1 2 R 1:10)			
(C 1 2 N 9/54			
C 1 2 R 1:125)			
(C 1 2 N 9/62			
C 1 2 R 1:685)			

(81) 指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, M C, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AU, BB, BG, BR, BY, CA, CN, CZ, FI, HU, JP, KP, KR, KZ, L K, LV, MG, MN, MW, NO, NZ, PL, RO, RU, SD, SK, UA, US, UZ, VN

(72) 発明者 ハンセン, キム

デンマーク国, デーコ—4632 ベベルス

コウ, カスタニエバイ 30

(72) 発明者 ブドルフセン, ギッテ

デンマーク国, デーコ—2000 フレデリ

ックスベルウ, 3, デーベ—リエバイ

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.